

Eur päls hes Pat ntamt
European Patent Offi
Offi europé n des br v ts



(11) **EP 1 260 509 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
27.11.2002 Bulletin 2002/48

(51) Int Cl.⁷: **C07D 311/72, A61K 31/355**

(21) Numéro de dépôt: **02291281.0**

(22) Date de dépôt: **24.05.2002**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(72) Inventeurs:
• **Brin, André Jean**
78290 Croissy sur Seine (FR)
• **Tapiero, Claude**
34080 Montpellier (FR)

(30) Priorité: **25.05.2001 FR 0106897**

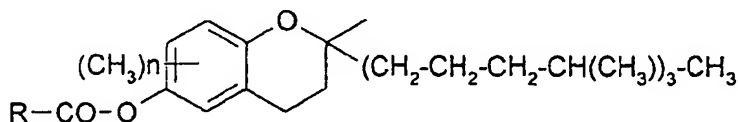
(74) Mandataire: **Burtin, Jean-François**
Cabinet GEFIB,
82, rue Baudin
92300 Levallois-Perret (FR)

(71) Demandeur: **Derma Developpement S.A.R.L.**
La Molière, 78290 Croissy sur Seine (FR)

(54) Utilisations d'esters de tocophérol

(57) La présente invention se rapporte à l'utilisation d'esters de Tocophérol et plus particulièrement à celles des esters d'acides gras mono-ou polyinsaturés en $\omega 3$ ou $\omega 6$.

Ces esters de Tocophérol sont représentés par la formule générale I:



dans laquelle R est le reste de la chaîne aliphatique d'un acide gras comportant au moins une double liaison éthylénique.

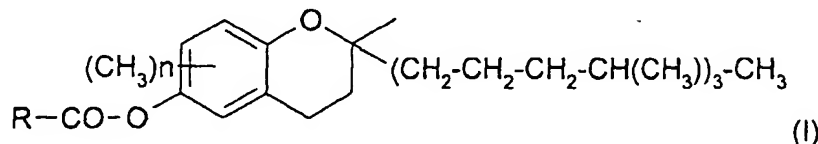
n est un nombre entier variant de 1 à 3.

Les composés de formule générale I selon l'invention peuvent être obtenus par un procédé qui consiste à préparer un dérivé fonctionnel d'acide gras polyinsaturé, puis à le faire réagir, éventuellement en présence d'un activateur du carboxyle et/ ou d'un catalyseur d'estérification, avec un tocophérol et à isoler l'ester de tocophérol et d'acide gras polyinsaturé.

Les composés de formule générale I servent de principes actifs à des compositions pharmaceutiques, cosmétiques et /ou diététiques ayant notamment une action anti-âge, anti-inflammatoire, anti-radicalaire et énergisante.

Description

[0001] La présente invention se rapporte à l'utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono-ou poly-insaturés de la série $\omega 3$ ou de la série $\omega 6$, répondant à la formule générale I



dans laquelle R est le reste de la chaîne aliphatique d'un acide gras portant au moins une double liaison et n est un nombre entier variant de 1 à 3,

[0002] L'invention comprend donc l'utilisation des esters de tocophérol et d'acides gras monoinsaturés ayant de 11 à 22 atomes de carbone. A titre d'exemple et de façon non limitative on pourra citer les esters d'acides undécylénique (C11 : 1), et les esters d'acides palmitoléique (C16 : 1)

[0003] L'invention comprend également l'utilisation des esters de tocophérol et d'acides gras polyinsaturés de la série $\omega 3$, à l'exception du γ -linoléate d' α -tocophérol. A titre d'exemple et de façon non limitative on pourra citer les esters d'acides α -linoléique (C18 : 3 $\omega 3$), octadécatétraénoïque (C18 : 4 $\omega 3$), éicosatétraénoïque (C20 : 4 $\omega 3$), et docosahexaénoïque (C22 : 6 $\omega 3$).

[0004] L'invention comprend également l'utilisation des esters de tocophérol et d'acides gras polyinsaturés de la série $\omega 6$. A titre d'exemple et de façon non limitative on peut citer les esters d'acides linoléique (C18 : 2 $\omega 6$), dihomog γ -linoléique (C20 : 3 $\omega 6$), arachidonique (C20 : 4 $\omega 6$), et docosapentaénoïque (C22 : 5 $\omega 6$).

[0005] Parmi les composés de formule générale I on distinguera les esters de tocophéryle et notamment les esters d' α -tocophérol, les esters de β -tocophérol, les esters de γ -tocophérol et les esters de δ -tocophérol. Les tocophérol peuvent être sous forme racémique (*dl*) ou sous forme optiquement active (*d* ou *l*).

[0006] Les composés de formule générale I selon l'invention peuvent être obtenus par un procédé qui consiste à préparer un dérivé fonctionnel d'acide gras mono ou polyinsaturé, puis à le faire réagir, éventuellement en présence d'un activateur du carboxyle et/ou d'un catalyseur d'estérification avec un tocophérol et à isoler l'ester de tocophérol et d'acide gras mono ou polyinsaturé.

[0007] Les composés de formule générale I selon l'invention peuvent être obtenus par un procédé qui consiste à transformer l'acide gras mono ou polyinsaturé en halogénure d'acide. La réaction d'estérification proprement dite est réalisée avec l' α -tocophérol en solution dans la pyridine. On peut activer la réaction en ajoutant une base tertiaire comme la triéthylamine ou la 4-diméthylaminopyridine. Comme halogénure d'acide gras mono ou polyinsaturé on pourra citer le chlorure, le bromure ou l'iodure ; le chlorure est le réactif préféré. On pourra également utiliser un anhydride d'acide ou un anhydride mixte avec un carbodiimide.

La méthode de purification utilisée est la chromatographie liquide sur colonne de gel de silice.

[0008] Les esters obtenus dans la présente invention ont été analysés par spectrométrie Infra rouge. Des bandes caractéristiques de ce type d'ester ont été déterminés :

3010 cm^{-1} = alcène ou alcane selon qu'on a une bande intense ou fine
 2926 cm^{-1} = alcène ou alcane selon qu'on a une bande intense ou fine
 2859 cm^{-1} = alcène ou alcane selon qu'on a une bande intense ou fine
 1756 cm^{-1} = carbonyle de la fonction ester (bande intense)
 1460/ 1376 cm^{-1} = CH₃-CH bande intense/ moyenne
 1136/ 1109 cm^{-1} 2 bandes intenses avec une différence de 30 cm^{-1} = éther/ éther aromatique
 920 cm^{-1} = alcène
 734 cm^{-1} = alcène

[0009] L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou diététiques, ayant une utilité chez l'Homme ou l'animal, et renfermant comme principe actif un ou des esters d'acide gras non saturé de tocophérol de formule générale I avec des excipients ou des véhicules appropriés.

[0010] Ces compositions ont pour objet l'utilisation en application topique des esters d'acide gras non saturé de tocophérol.

Les compositions selon l'invention peuvent donc se trouver sous la forme libre ou sous forme encapsulée ou sous forme de liposome pour une meilleure diffusion.

[0011] Les compositions de la présente invention sont particulièrement aptes à l'application locale notamment sous la forme de gel, de crème H/E ou E/H, d'émulsion, de lotions, de pommade, de poudre, de lotion capillaire, de spray, d'ampoule, de sérum ou de patches.

Elles sont également adaptées notamment pour l'administration, par voie orale, sous forme de solution buvable ou de capsule.

[0012] Dans ces compositions, la teneur en principe actif de formule générale I peut varier de 0,001 % à 15 % et plus particulièrement de 0,01 à 5% en fonction du mode d'administration ou du mode d'application de ces compositions.

[0013] Elles renferment en outre des agents solubilisants, des polymères épaississants, des huiles de silicone, des agents stabilisants, des agents émulsionnants.

[0014] D'une manière préférée, on utilisera des supports destinés à être dilués ou incorporés dans des préparations telles que des crèmes ou des gels. La phase huileuse contenant éventuellement des agents tensioactifs non ioniques et/ou des silicones est ensuite additionnée d'une phase aqueuse contenant éventuellement un agent gélifiant ou un agent épaississant. Après agitation prolongée, on obtient ainsi une émulsion que l'on incorpore dans une base cosmétique, grasse ou non grasse, pour réaliser une crème ou un gel. On procédera de manière semblable pour les préparations à phase continue huileuse.

[0015] La phase huileuse contient éventuellement des agents tensioactifs non ioniques et/ou des silicones.

[0016] On pourra également utiliser l'ester d'acide gras de tocophérol dans la glycérine, l'incorporer dans une solution de polyéthylène glycol contenant un agent dispersant ou tensioactif, et l'ajouter d'une huile de silicone pour réaliser une émulsion fluide que l'on peut, si désiré, colorer et/ou parfumer à l'aide d'une essence de fleurs ou de plantes naturelle ou bien encore avec une substance odoriférante comme une ionone le lavendulol ou un parfum.

[0017] Les compositions peuvent ainsi contenir un agent émulsionnant comme un stéarate d'éthylène glycol, un stéarate de sorbitol + polysorbate 60, le PEG-20 sesquistéarate de méthyl glucose, le PEG-30 dipoly hydroxy stéarate + sorbitol et esters de glycérol, ou encore le cétyl diméthicone copolyol.

[0018] Parmi les polymères que l'on peut adjoindre, on citera en particulier les agents épaississants comme les polymères d'éthylène glycol comme le PEG 400, le PEG 600 ou des dérivés de la cellulose comme la β -hydroxy éthyl cellulose ou l'hydroxypropyl méthyl cellulose ou la méthyl cellulose.

[0019] Parmi les solubilisants, on peut adjoindre à la préparation soit des huiles polaires telles que l'huile de jojoba, des triglycérides d'acide caprylique ou caprique, de l'huile de macadamia, de l'huile de cameline, de l'huile de lin ou de l'huile de kiwi, soit des carbures apolaires comme l'isohexadécane, de l'huile minérale, du squalane soit encore des huiles siliconées comme la diméthicone, la cyclométhicone, la phenyl triméthicone, le mélange de cyclopentasiloxane et de diméthicone copolyol.

[0020] Comme gélifiants on peut citer à titre d'exemple les carbomères tels que les acrylates/ C10-30 alkoyl acrylate de polymère croisé 1,2 et 3 ou des gels naturels comme la gomme xanthane ou les alginates tels que l'alginate de sodium, un mélange de polyacrylamide et de C13-14 isoparaffine et de laureth-7 polysaccharide.

[0021] Les compositions peuvent être employées plus efficacement que les compositions de l'art antérieur qui utilisent une simple association d'acide gras poly-insaturé et d' α tocophérol, notamment en ce qui concerne :

- * l'influence sur la synthèse des constituants du derme comme le collagène, l'élastine, l'acide hyaluronique et les protéoglycanes.

- * l'influence sur la synthèse des lipides cutanés de type céramides et sur les métalloprotéases et protéines kinases.

- * l'action anti-vieillesse

- * l'action anti-radicalaire HX/XO et anti UVB.

- * l'action anti-inflammatoire

- * l'effet stimulant sur la capacité respiratoire des mitochondries.

- * l'action énergisante sur les cellules.

[0022] L'exemple I suivant illustre l'invention sans toutefois la limiter.

Exempl I :

[0023] Dans un ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant ascendant, d'une agitation mécanique et purgé par un flux d'azote, on dissout 10,32 g (37 mmoles) d'acide γ -linoléique à 99% dans 70 ml de CH_2Cl_2 puis on ajoute en une

portion 11ml (144 mmoles) de chlorure de thionyle. On porte à reflux pendant 90 minutes. L'excès de chlorure de thionyle et le solvant sont chassés sous vide. On obtient une huile incolore à laquelle on incorpore 4 ml (49mmoles) de pyridine et 50 ml de CH₂Cl₂. Une solution de 15,4 g de *dl*- α -tocophérol à 98 % dans 50 ml de CH₂Cl₂ est ajoutée goutte à goutte en 30 minutes. Le milieu est porté à reflux pendant 60 minutes et un solide blanc, floconneux apparaît en suspension. Après une nuit de repos, le milieu est neutralisé par 75 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0.67 N. Après décantation et extraction par 3 x 30 ml d'éther isopropylique, les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec pour donner une huile jaune pâle qui est chromatographiée sur une colonne (hauteur 55 mm, diamètre 190mm) de gel de silice (70-200 μ m), par un mélange éluant éther isopropylique/hexane 1 : 9 (Rf 0, 28). On recueille 16.8 g d'une huile très légèrement colorée en jaune (Rdt 66%) constituée essentiellement de γ -linolénate d' α -tocophéryle.

[0024] Le γ -linolénate d' α -tocophéryle peut être différencié des autres dérivés du tocophérol par son temps de rétention en HPLC. Une colonne de silice de type Nucléosil 8 μ m (300 mm x 4,6 mm) peut-être utilisée. Le γ -linolénate d' α -tocophéryle est dilué dans l'acétone à 1%. La phase mobile est le THF 2% / Hexane 98%.

Le débit est fixé à 1ml/min ; Le γ -linolénate d' α -tocophéryle a un temps de rétention de 4,06 minutes.

[0025] De la même façon, en utilisant la même quantité d'un autre acide gras mono ou polyinsaturé de la série ω 3 ou ω 6 et selon le même mode opératoire, on pourra obtenir les autres esters de tocophérol d'acide gras mono ou polyinsaturé.

[0026] Des exemples non limitatifs de compositions selon l'invention sont présentées ci-dessous :

Formulation 1 :

Crème

[0027]

γ -linolénate d' α tocophéryle 0.5 %
Glycérine 5%
Poly propylène de glycérol-26-butyreth-26 4%
Poly éthylène glycol-40 dans l'huile de ricin hydrogénée 4%
eau qsp 100

Formulation 2 :

Capsule

[0028]

γ -linolénate d' α tocophéryle 2 %
Huile de cameline 1000 mg
pour une capsule

Formulation 3 :

Crème

[0029]

Alcool cétéarylique et cetearéth-20 3,5 %
Alcool cétylique 3,5 %
Palmitate d'octyle 9%
 γ -linolénate d' α tocophéryle 0.5 %
Caséine- Gomme xanthane 1%
eau qsp 100

Formulation 4 :

[0030]

Emulsion huile dans l'eau

Phase A	Glycérol	4 %
	Carbomère	1
Phase B	Eau désionisée	qsp100
Phase C	PEG-78-glyceryl cocoate	1
	γ -linolénate d' α tocophéryle 0.5 %	
	Huile essentielle d'orange amère	0,1
Phase D	Conservateur (s)	0,7
Phase E	NaOH diluée à 10%	qsp pH=6

Additionner la phase A dans la Phase B.

Sous agitation additionner la Phase C.

Puis ajouter la phase C sous forte agitation

Une fois homogénéisation complète, ajouter D.

Stabiliser le pH à 5 -6 par de la soude diluée.

ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES DE FORMULE I

1. Etude d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé, sur l'activité de la tyrosine kinase sur des mélanocytes humains.

5. Préparation des cellules

[0031] Les mélanocytes humains sontensemencés à la densité de 50 000 cellules/cm² dans des plaques multipuits. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂. Le milieu de culture est le MCDB 153 supplémenté par l'EGF (5 ng/mL) (Sigma), l'insuline (5 µg/mL)(Sigma), l'hydrocortisone (5 ng/mL)(Sigma), du sérum de veau foetal (SVF) à 5 % (v/v)(Gibco).

Le milieu de culture est remplacé après 24 heures de culture et supplémenté par des antibiotiques (Peni-Strepto) (Gibco) à 1% (V/v) contenant les différentes concentrations d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé (1, 10 et 100 µg/mL).

[0032] Ce sont des concentrations non cytotoxiques qui ne modifient pas la croissance cellulaire.

Une série « témoin positif» est constituée de cellules traitées à l'hydroquinone à 1 µg/mL.

6. Evaluation de l'activité tyrosine kinase.

[0033] Les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂.

A la fin de la période d'incubation, le milieu de culture est prélevé et la couche cellulaire rincée deux fois avec du PBS.

450 µL de Triton X100 à 1% (v/v) dans le PBS sont ajouté dans chaque puits. On agite pendant 10 minutes puis on ajoute 50 µL de L-Dopamine à 10 mM dans du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺

[0034] On laisse incuber pendant 1 heure à 37°C à l'abri de la lumière, puis on mesure l'absorption à 475 nm au spectrophotomètre.

Tableau 1

	témoin	hydroquinone	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
moyenne absorbance à 475 nm	0.044 ± 0.002	0.024 ± 0.001	0.046 ± 0.000	0.052 ± 0.003	0.050 ± 0.002

Résultats

[0035] Un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé à la concentration de 10 µg/mL exerce une stimulation de la tyrosinase de l'ordre de 18 %.

2. Etude d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé sur l'activité anti-inflammatoire sur une préparation de monocytes/macrophages humains activés ou non par les LPS (lipopolysaccharides).

a) Préparation des monocouches de monocytes/macrophages humains.

[0036] Les monocytes/macrophages sont purifiés à partir d'une poche de sang. Le « Buffy coat » est prélevé stérilement et dilué 7 fois dans un tampon PBS-EDTA.

Une solution de Percoll (Pharmacia) est préparée extemporanément :

- solution A : 9 mL de Percoll + 1 mL de NaCl 1,5 M
- solution B : 6 mL de solution A + 4 mL de NaCl 1,5 M 24 tubes sont préparées (7 mL de « Buffy coat » dilué + 4 mL de solution B, centrifugés 800 G pendant 30 minutes à température ambiante.

[0037] L'interface contenant les cellules mononuclées est prélevée et rincée 2 fois avec du PBS-EDTA (5mM) puis avec du milieu Ham F12 (Gibco) supplémenté avec du sérum de veau foetal (SVF) à 10 % inactivé par la chaleur. Le culot est suspendu dans du milieu Ham F12 supplémenté par de la L-glutamine (2mM) et du SVF à 20%. On obtient une suspension à 4×10^6 cellules/mL.

[0038] Les cellules sontensemencées à la densité de 4×10^6 cellules/puits dans des plaques multipuits.

[0039] Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 2 heures de façon à obtenir une population cellulaire adhérente de 110 000 à 150 000 cellules/cm² composée à 95 % de monocytes/macrophages. Le milieu est ensuite remplacé par du Ham F12 supplémenté par du SVF à 5 % et de la L-glutamine à 2 mM.

[0040] Une série « témoin positif » est constituée de cellules traitées au phénol à 640 µg/mL. L'étude est réalisée avec différentes concentrations d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé (1, 10, 50, 100 et 500 µg/mL).

[0041] Deux séries de tubes sont supplémentés par 1 et 5 µg/mL de LPS.

[0042] Les monocytes/macrophages sont incubés pendant 24 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂. Le milieu de culture est prélevé (mis à -80°C). Une seconde incubation de 24 heures est effectuée dans les conditions identiques.

[0043] La couche cellulaire est incubée en présence de trypsine-EDTA. Les cellules détachées sont centrifugées puis mises en suspension dans 300 µL d'eau distillée.

Les IL-1α sont dosées à l'aide du Kit Immunotech dans le compartiment intracellulaire (0-48 heures) et dans le compartiment milieu de culture (0-24 heures et 24-48 heures).

[0044] Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2

compartiment intracellulaire (0-48 heures)		
µg/mL	IL-1α (pg/puits)	IL-1α (pg/10 ⁶ cellules)
Témoin	26 ± 7	82 ± 22
500	71 ± 24	250 ± 83
100	65 ± 9	229 ± 31
50	43 ± 5	145 ± 17
10	40 ± 8	135 ± 27
1	35 ± 3	123 ± 9
LPS 1	958 ± 85	3199 ± 284
LPS 5	1651 ± 62	5393 ± 201
µg/ml	IL-1α (pg/puits)	IL-1α (pg/10 ⁶ cellules)
Témoin	51,6 ± 8,9	176 ± 30
500 + LPS1	362,1 ± 91,4	1213 ± 306
100+ LPS1	464,1 ± 20,2	1543 ± 67
50 + LPS1	506,0 ± 78,5	1721 ± 267
10 + LPS1	324,5 ± 87,3	1053 ± 283
1 + LPS1	444,8 ± 87,1	1389 ± 272

EP 1 260 509 A1

Tableau 2 (suite)

compartiment intracellulaire (0-48 heures)		
$\mu\text{g/mL}$	IL-1 α (pg/puits)	IL-1 α (pg/10 ⁶ cellules)
LPS1	468,5 \pm 122,9	1570 \pm 412
$\mu\text{g/ml}$	IL-1 α (pg/puits)	IL-1 α (pg/10 ⁶ cellules)
Témoin	51,6 \pm 8,9	175,7 \pm 304,4
500 + LPS 5	372,9 \pm 47,3	1399,7 \pm 176,2
100+ LPS 5	498,3 \pm 67,9	1677,9 \pm 228,6
50 + LPS 5	585,4 \pm 64,3	1903,7 \pm 209,1
10 + LPS 5	696,0 \pm 50,1	2188,5 \pm 157,6
1 + LPS 5	1253	4540
LPS 5	1208,1 \pm 25	4216,6 \pm 87,2

Résultats

[0045] Il n'y a pas de variation significative du taux d'IL-1 α de base en présence d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono-ou polyinsaturé à une concentration de 1 à 500 $\mu\text{g/ml}$.

Pour une concentration de LPS à 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$ en l'absence d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé, le taux d'IL-1 α est respectivement multiplié par 39 et 66, ce qui démontre une bonne réactivité du système test.

- Un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé à une concentration de 1 à 500 $\mu\text{g/ml}$ n'a pas d'effet significatif sur le taux intracellulaire des IL-1 α des monocytes/ macrophages humains activés par des LPS à 1 $\mu\text{g/ml}$.
- Un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé exerce une inhibition dose-dépendante maximale pour 500 $\mu\text{g/mL}$ (- 67%) sur le taux intracellulaire des IL-1 α des monocytes/ macrophages humains activés par des LPS à 5 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau 3

compartiment milieu de culture (0-24 heures)	
$\mu\text{g/ml}$	IL-1 α (pg/puits)
Témoin	99 \pm 4
500	157 \pm 28
100	94 \pm 4
50	116 \pm 9
10	107 \pm 4
1	103 \pm 6

Résultats

[0046] Les résultats sont exprimés en pg/puits (il n'y a pas de comptage cellulaire pour ce temps d'incubation). Il n'y a pas de variation significative du taux d'IL-1 α de base en présence d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé à une concentration allant de 1 à 500 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau 4

compartiment milieu de culture (24-48 heures)		
$\mu\text{g/mL}$	IL-1 α (pg/puits)	IL-1 α (pg/10 ⁶ cellules)
Témoin	99 \pm 3	311 \pm 9

EP 1 260 509 A1

Tableau 4 (suite)

compartiment milieu de culture (24-48 heures)		
µg/mL	IL-1α (pg/puits)	IL-1α (pg/10 ⁶ cellules)
500	71 ± 4	250 ± 14
100	103 ± 19	362 ± 68
50	86 ± 18	287 ± 59
10	67 ± 4	228 ± 12
1	75 ± 3	263 ± 9
LPS 1	334 ± 35	1116 ± 116
LPS 5	668 ± 70	2181 ± 227
Témoin	35,9 ± 5,3	122 ± 18
500 + LPS1	239,6 ± 74,0	803 ± 248
100+ LPS1	125,5 ± 18,0	417 ± 60
50 + LPS1	156,1 ± 23,3	531 ± 79
10 + LPS1	124,8 ± 26,9	405 ± 87
1 + LPS1	99,5 ± 42,1	1389 ± 272
LPS1	112, ± 24,3	376 ± 82
µg/mL	IL-1α (pg/puits)	IL-1α (pg/10 ⁶ cellules)
Témoin	36 ± 5	122 ± 18
500 + LPS 5	412 ± 51	1534 ± 184
100+ LPS 5	164 ± 21	551 ± 71
50 + LPS 5	173 ± 50	561 ± 164
10 + LPS 5	129 ± 32	404 ± 10
1 + LPS 5	178 ± 5	647 ± 16
LPS 5	225 ± 24	787 ± 83

- Un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé à une concentration de 1 à 100 µg/ml n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion des IL-1α par des monocytes/ macrophages humains activés par des LPS à 1 µg/ml.
Par contre à une concentration de 500 µg/mL en ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé on observe une augmentation (x2) du taux d' IL-1α dans le milieu de culture .

Conclusion

[0047] Un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé exerce un potentiel de régulation de l'inflammation observé sur la sécrétion des IL-1α par des monocytes/macrophages humains activés par des LPS à 5 µg/ml.

3- Etude d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé sur la synthèse de l'élastine et du collagène par des fibroblastes humains.

5. Préparation des cellules

[0048] Les cellules sontensemencées à la densité de 50 000 cellules/cm² dans des plaques multipuits. Les cellules sont incubées à 37°C n atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂.

EP 1 260 509 A1

Le milieu de culture est l'IMDM supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF) à 10 % (v/v)..

Le milieu de culture est remplacé après 24 heures d'incubation et supplémenté par des antibiotiques (Penicilline-Streptomycine) à 0,2 % (V/V) contenant les différentes concentrations d'ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé (1, 5, 10, 50 et 100 µg/ml).

5 Le milieu de culture est supplémenté par de l'acide ascorbique à 50 µg/mL.

[0049] Une série « témoin positif » est constituée de cellules traitées par le TGF-β à 10 ng/mL.

6. Evaluation de la synthèse de l'élastine et du collagène

10 [0050] Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 24 heures.

[0051] A la fin de la période d'incubation, le milieu de culture est prélevé et la couche cellulaire rincée deux fois avec du PBS supplémenté d'inhibiteurs de protéases afin d'obtenir les concentrations suivantes : EDTA 0,01 M, acide 6-amino hexanoïque 0,1 M, chlorure de benzamimidium 0,005 M, iodoacétamide 0,1 mM.

15 [0052] La couche cellulaire est grattée dans 500 µl de PBS contenant les inhibiteurs de protéases puis est passée aux ultrasons (2x 20 sec à intervalles de 20 sec ; 50Hz)

[0053] Le dosage colorimétrique de l'élastine est réalisé à partir de la liaison spécifique du colorant 5,10,15,20 tétraphényl-21, 23 porphyrine sulfate (TPPS) (Kit Fastin Elastin Assay)

Résultats

20

[0054] Matrice extracellulaire

Tableau 5

25

µg/ml	Elastine (µg/puits)	Elastine (µg/10 ⁶ cellules)
Témoin	38,5 ± 4,7	289 ± 35
TGF-β à 10 ng/ml	56,4 ± 2,3	422 ± 17
1	31,7 ± 9,3	242 ± 71
5	23,2 ± 1,7	174 ± 13
10	31,8 ± 4,5	241 ± 34
50	32,2 ± 2,0	260 ± 16
100	16,4 ± 0,9	139 ± 8

30

35

Tableau 6

40

µg/ml	Collagène (µg/puits)	Collagène (µg/10 ⁶ cellules)
Témoin	37,5 ± 4,4	281 ± 33
TGF-β à 10 ng/ml	76,9 ± 13,0	576 ± 97
1	30,2 ± 15,5	230 ± 118
5	29,8 ± 10,3	224 ± 77
10	43,4 ± 6,5	329 ± 49
50	50,4 ± 15,9	407 ± 129
100	39,4 ± 8,6	336 ± 73

45

50

[0055] Dans le milieu de culture

Tableau 7

55

µg/ml	Elastine (µg/puits)	Elastine (µg/10 ⁶ cellules)
Témoin	77,4 ± 3,7	580 ± 28
TGF-β à 10 ng/ml	83,3 ± 0,1	624 ± 1

EP 1 260 509 A1

Tableau 7 (suite)

$\mu\text{g/ml}$	Elastine ($\mu\text{g/puits}$)	Elastine ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)
1	$68,2 \pm 11,2$	521 ± 85
5	$78,2 \pm 16,5$	587 ± 124
10	$150,5 \pm 12,4$	1140 ± 94
50	$145,5 \pm 5,8$	1176 ± 47
100	$121,9 \pm 5,5$	1037 ± 47

Tableau 8

$\mu\text{g/ml}$	Collagène ($\mu\text{g/puits}$)	Collagène ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)
Témoin	47 ± 12	355 ± 91
TGF- β à 10 ng/ml	65 ± 10	484 ± 75
1	39 ± 12	297 ± 95
5	66 ± 26	499 ± 196
10	72 ± 40	542 ± 306
50	66 ± 19	533 ± 150
100	48 ± 29	409 ± 249

[0056] Les concentrations entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé stimulent significativement la synthèse de l'élastine et du collagène. L'effet est maximum pour 50 $\mu\text{g/mL}$ (+ 65% pour l'élastine et + 45% pour le collagène) avec une augmentation de la sécrétion de l'élastine dans le milieu de culture (+ 102%), alors que l'effet du TGF- β à 10 ng/mL se traduit principalement par une augmentation de la synthèse au niveau de la matrice extracellulaire (+ 46%).

4- Etude d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé sur l'action anti UVB.

5. Préparation des feuillets épidermiques

[0057] Les kératinocytes humains sontensemencées à la densité de 100 000 cellules/ cm^2 dans des inserts dont le fond est constitué d'une membrane en polycarbonate de porosité 0,4 μm .

[0058] Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2 pendant 24 à 48 heures, en « situation immergée » dans le milieu de culture MCDB/153 supplémenté par l'EGF (5 ng/ml), l'insuline (5 $\mu\text{g/ml}$), l'hydrocortisone (5 ng/mL), le BPE (70 $\mu\text{g/ml}$)

[0059] Le milieu de culture est remplacé par le même milieu de culture supplémenté par 1 mM de Ca^{++} afin d'induire la stratification de la monocouche en « situation immergée » pendant 6 jours. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours.

[0060] Le feuillet épidermique est mis en « situation émergée » au 7^{ème} jour, c'est à dire qu'il n'est plus nourri que par l'intermédiaire des cellules basales.

[0061] Au 14^{ème} jour d'incubation, le milieu de culture est changé. Différentes concentrations d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé (1, 5, 10, 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$), ou de vitamine E (150 μl) constituant le « témoin positif » sont appliquées sur un disque de papier Whatman couvrant la surface de la culture cellulaire.

6. Evaluation de la cytotoxicité (Test au MTT)

[0062] Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2 pendant 24 heures, puis irradiées par les UVB (0,7 J/ cm^2 , $\lambda = 314$ nm) après avoir enlevé les disques de papier Whatman.

Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2 pendant 24 heures, après avoir déposé sur la surface de la culture cellulaire les disques de papier Whatman imbibés des différentes concentrations d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé ou de vitamine E.

[0063] Après l'incubation, les milieux de culture sont utilisés pour le dosage des produits du clivage du MTT.

[0064] Après l'incubation, les membranes portant le feuillet épidermique sont rincées 2 fois avec du PBS, puis incubées 3 heures à 37 °C, à l'obscurité, en présence de 2 ml de MTT (bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényl tétrazolium) à 0,5 mg/ml. Les cristaux violets de formazan produits par le clivage du MTT par les enzymes mitochondriaux sont dissous dans 2 ml de DMSO sous agitation douce pendant 2 heures à température ambiante. On mesure l'absorption à 540 nm au spectrophotomètre.

Tableau 9

compartiment intracellulaire							
	témoin	témoin + UVB	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
moyenne absorbance à 540 nm	1,504 ± 0.084	0.710 ± 0.076	0.693 ± 0.068	0.682 ± 0.069	1,049 ± 0.117	0,698 ± 0.035	0,809 ± 0.132

Tableau 10

compartiment milieu de culture							
	témoin	témoin + UVB	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
moyenne absorbance à 540 nm	1,504 ± 0.084	0.710 ± 0.076	0.693 ± 0.068	0.682 ± 0.069	1,049 ± 0.117	0,698 ± 0.035	0,809 ± 0.132

[0065] On observe une inhibition sensible de l'effet cytotoxique induit par l'irradiation, en présence d'une concentration en ester d'acide gras de tocophérol à 10 µg/ml.

5- Etude d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé sur l'activité mitochondriale de fibroblastes de derme humain.

5. Préparation des cellules

[0066] Les fibroblastes de derme humain sontensemencées à la densité de 5000 cellules/cm² dans 500 µl de milieu IMDM supplémenté par du SVF 10% pendant 24 heures en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂.

[0067] Après 24 heures, les cellules sont mises en contact avec les différentes concentrations d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé (10, 50 et 100 µg/ml).

[0068] Ce sont des concentrations non cytotoxiques qui ne modifient pas la croissance cellulaire.

[0069] Une série « témoin positif » est constituée de cellules traitées à l'antimycine à 0,5 µM.

6. Evaluation de l'activité mitochondriale

[0070] Principe : L'incorporation cellulaire de rhodamine 123 est la conséquence de la variation du potentiel transmembranaire mitochondrial. L'évaluation semi-quantitative de la respiration mitochondriale est basée sur l'intensité de la fluorescence à l'intérieur de la cellule.

[0071] Les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂. A la fin de la période d'incubation, le milieu de culture est prélevé et la couche cellulaire rincée deux fois avec du milieu IMDM puis mise dans 500 µl de tampon phosphate pH 7.2 contenant 0.1 mg/ml de rhodamine 123.

[0072] On laisse incuber pendant 15 minutes à 37 °C, puis on mesure la fluorescence de façon semi-quantitative à l'aide d'une échelle de cotation.

R'sultats

[0073]

Tableau 11

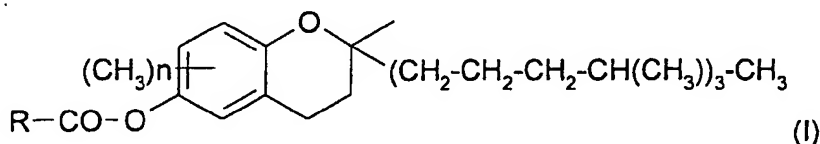
µg/ml	4	3	2	1	0	Nombre cellules observées
Témoin	12,3 ± 2,1	25,7 ± 3,1	25,0 ± 2,4	21,0 ± 2,9	17,7 ± 2,1	104,0 ± 9
Témoin Antimycine	10,7 ± 2,5	13,3 ± 2,4	20,0 ± 1,6	16,3 ± 1,9	25,0 ± 4,1	100 ± 9
10	19,7 ± 1,2	32,3 ± 2,1	26,3 ± 2,4	14,7 ± 0,5	8,7 ± 1,9	102,0 ± 5
50	35,3 ± 0,5	44,0 ± 1,4	18,3 ± 8,5	3,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	102,0 ± 9
100	12,3 ± 2,1	58,3 ± 6,2	20,3 ± 0,5	9,3 ± 0,5	0,0 ± 0,9	100,0 ± 9

[0074] Echelle de cotation (intensité de fluorescence) : 0 : cytoplasme non fluorescent, 1 : faible ; 2 : moyennement intense ; 3 : Importante ; 4 : Très importante, tout le cytoplasme est fluorescent.

[0075] La stimulation est maximale pour une concentration d'un ester de tocophéryle avec un acide gras mono ou polyinsaturé à 50 µg/ml ; +65% par rapport au témoin.

Revendications

1. Utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono ou polyinsaturés de la série $\omega 3$ ou de la série $\omega 6$, répondant à la formule générale I



dans laquelle R est le reste de la chaîne aliphatique d'un acide gras portant au moins une double liaison et n est un nombre entier variant de 1 à 3,

en vue de la réalisation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou diététiques pour le traitement réparateur de la peau par action sur la synthèse des constituants du derme et présentant une action stimulante de la capacité respiratoire des mitochondries.

2. Utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono ou polyinsaturés selon la revendication 1, dans laquelle les esters de Tocophérol d'acides gras mono insaturés sont choisis dans le groupe formé des acides undécylénique (C11 :1) et palmitoléique (C16 : 1)

3. Utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono ou polyinsaturés selon la revendication 1, dans laquelle les esters de Tocophérol d'acides gras polyinsaturés sont choisis dans le groupe formé des acides γ -linolénoïque (C18 : 3 ω 6), α -linolénoïque (C18 : 3 ω 3), octadécatétraénoïque (C18 : 4 ω 3), éicosatétraénoïque (C20 : 4 ω 3), docosahexaénoïque (C22 : 6 ω 3), linoléïque (C18 : 2 ω 6), dihom- γ -linolénoïque (C20 : 3 ω 6), arachidonique (C20 : 4 ω 6), et docosapentaénoïque (C22 : 5 ω 6).

4. Utilisation d'esters de Tocophérol d'acides gras mono ou polyinsaturés selon la revendication 1, dans laquelle le tocophérol est choisi parmi l' α -tocophérol, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol.

5. Utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono ou polyinsaturés selon la revendication 1, en mélange ou dilué avec un excipient ou un véhicule approprié pour l'usage chez l'homme ou l'animal.

6. Utilisation d'esters de Tocophérol avec des acides gras mono-ou polyinsaturés selon la revendication 1, dans

laquelle la teneur en ester de tocophéryle d'un acide gras polyinsaturé varie de 0,001 % à 15 % et plus particulièrement de 0,01 à 5% en fonction du mode d'administration ou du mode d'application de ces compositions.

7. Procédé de préparation d'esters de tocophérol et d'acides gras mono-insaturé ou polyinsaturés de la série ω 3 ou ω 6, qui consiste à transformer l'acide gras mono ou polyinsaturé en halogénure d'acide, puis à réaliser la réaction d'estérification proprement dite avec un tocophérol choisi parmi l' α -tocophérol, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol, en solution dans la pyridine et à isoler l'ester formé.

8. Le γ -linolénate de tocophéryle tel qu'obtenu par le procédé de la revendication 8, caractérisé en ce que son temps de rétention est de 4,06 minutes sur une colonne de silice de type Nucléosil 8 μ m après que le γ -linolénate d' α -tocophéryle ait été dilué dans l'acétone à 1% avec une phase mobile de THF 2% / Hexane 98%.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 02 29 1281

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
Y	WO 99 32105 A (DCV INC) 1 juillet 1999 (1999-07-01) page 1, lignes 12, 20	1-6	C07D311/72 A61K31/355
Y	* exemple 13 *	7	
Y	WO 00 02554 A (ANNUNZIATA ELEONORA ; PANIN GIORGIO (IT)) 20 janvier 2000 (2000-01-20) * page 2, ligne 24; page 4, lignes 6-23 *	1-6	
Y	EP 0 231 777 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12 août 1987 (1987-08-12) * page 6 - page 7 *	7	
X	EP 0 356 270 A (AZAR ROGER F ; GRINDA JEAN ROBERT (FR)) 28 février 1990 (1990-02-28) * exemple V *	8	
A	DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MIYASHITA, SHIGEO ET AL: "Skin cosmetics" retrieved from STN Database accession no. 80:63760 XP002189539 * abrégé * & JP 48 014932 B (POLA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 11 mai 1973 (1973-05-11)	1-6	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7)
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 010, no. 203 (C-360), 16 juillet 1986 (1986-07-16) -& JP 61 044853 A (TERUMO CORP), 4 mars 1986 (1986-03-04) * abrégé *	1-6	C07D A61K A61P
X	* composé 1, page 525 *	8	
		-/--	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 14 août 2002	Examineur Frelon, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1500 03.92 (F04002)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 02 29 1281

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
Y	<p>DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MOTOI, TOSHIYUKI: "Hair tonics containing tocopherol linoleate" retrieved from STN Database accession no. 106:162380 XP002189545 * abrégé *</p> <p>& JP 61 289022 A (KANEBO, LTD., JAPAN) 19 décembre 1986 (1986-12-19)</p>	1-6	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7)</p>
Y	<p>DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SIMIDZHIEV, I. ET AL: "Effect of alpha-tocopherol and its derivatives on ATPase activity and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria" retrieved from STN Database accession no. 108:54735 XP002189547 * abrégé *</p> <p>& BYULL. EKSP. BIOL. MED. (1987), 104(9), 299-301,</p>	1-6	
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 54, no. 4, 25 février 1960 (1960-02-25) Columbus, Ohio, US; abstract no. 3401b, P.F.G. PRAILL: XP002190483 * abrégé *</p> <p>& J. CHEM. SOC., 1959, pages 3100-3101,</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	7	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 14 août 2002	Examineur Frelon, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.02 (P0402)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 02 29 1281

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
Y	FR 2 420 523 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO) 19 octobre 1979 (1979-10-19) * exemple 6; tableau 9 *	7	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 14 août 2002	Examineur Frelon, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : antérie-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1500 (3.12.02) (P4402)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 02 29 1281

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

14-08-2002

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9932105	A	01-07-1999	AU 2091099 A	12-07-1999
			EP 1041979 A1	11-10-2000
			JP 2001526219 T	18-12-2001
			WO 9932105 A1	01-07-1999
			US 6136985 A	24-10-2000
WO 0002554	A	20-01-2000	IT MI981586 A1	10-01-2000
			AU 4385899 A	01-02-2000
			BR 9911945 A	27-03-2001
			CN 1308531 T	15-08-2001
			CZ 20010036 A3	15-08-2001
			EP 1094807 A1	02-05-2001
			HU 0102781 A2	28-12-2001
			WO 0002554 A1	20-01-2000
			NO 20006719 A	16-02-2001
			PL 345500 A1	17-12-2001
			SK 352001 A3	11-06-2001
			TR 200100014 T2	21-06-2001
			TR 200103710 T2	21-06-2002
EP 0231777	A	12-08-1987	US 4760095 A	26-07-1988
			DE 3768820 D1	02-05-1991
			EP 0231777 A1	12-08-1987
			JP 7055884 B	14-06-1995
			JP 62215514 A	22-09-1987
EP 0356270	A	28-02-1990	FR 2633926 A1	12-01-1990
			EP 0356270 A2	28-02-1990
JP 48014932	B	11-05-1973	AUCUN	
JP 61044853	A	04-03-1986	AUCUN	
JP 61289022	A	19-12-1986	JP 1879287 C	07-10-1994
			JP 6004521 B	19-01-1994
FR 2420523	A	19-10-1979	FR 2420523 A1	19-10-1979

EPO FORM P4480

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82